

ÉTUDES DU DICHROISME CIRCULAIRE ET DES SPECTRES INFRAROUGES DES POLYPEPTIDES ET PROTÉINES EN SOLUTION AQUEUSE,

par SERGE N. TIMASHEFF, H. SUSI et ROBERT TOWNEND.

[Eastern Regional Research Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Philadelphia, Pa., 19118,
et Graduate Department of Biochemistry, Brandeis University, Waltham, Mass., 02181.]

SOMMAIRE

Des polypeptides de synthèse en diverses conformations ont été étudiés par la spectroscopie infrarouge dans la zone spectrale de la bande amide I, aussi bien que par le dichroïsme circulaire dans la région de l'ultraviolet (entre 185 et 240 m μ), en solution aqueuse. Les résultats de ces études indiquent qu'il devrait être possible d'effectuer des études similaires sur les protéines globulaires en solution.

SUMMARY

Infrared spectra in the region of the amide I band and ultraviolet circular dichroism spectra between 185 and 240 m μ have been determined in aqueous medium for a number of polypeptides in various conformations. As a result, it would appear that a similar examination of globular proteins is possible.

I. — Introduction.

Les positions et intensités des bandes d'absorption dans différentes régions spectrales sont une fonction de la conformation des structures polypeptidiques. Nous avons étudié en solution aqueuse l'effet de la conformation sur le dichroïsme circulaire dans les régions spectrales de l'ultraviolet (185-240 m μ) et sur la bande amide I du spectre infrarouge (1 600-1 700 cm⁻¹). Les résultats de ces études, aussi bien qu'une revue bibliographique, sont résumés dans la communication présente.

Quand nous étudions les conformations des polypeptides et des protéines, nous examinons, en fait, des polymères, dont l'unité de structure est le groupement peptidique, — (NH — CO — CHR) —; R peut être l'un d'une vingtaine de résidus d'acides aminés. Donc, la question importante est la géométrie décrite par les positions dans l'espace des grou-

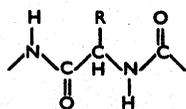
pements peptidiques, aussi bien que les interactions qui prennent place entre ces groupements. L'effet des chaînes des résidus, R, n'est que d'un intérêt secondaire, car ces radicaux ne peuvent que renforcer ou affaiblir la stabilité de la conformation, par suite d'effets stériques, de la formation de liens hydrogènes et d'ionisation dans le cas de résidus polaires, ou d'effets hydrophobes dans le cas de résidus hydrocarbonés. Nous résumerons les résultats obtenus dans la région spectrale de l'infrarouge, puis ceux du dichroïsme circulaire ultraviolet.

II. — Spectres infrarouges des polypeptides.

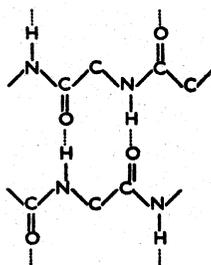
Les spectres infrarouges des polypeptides de synthèse et de protéines fibrillaires, orientés en films ou en fibres, ont été mesurés depuis une trentaine d'années (1). Cependant, ce n'est que depuis le travail de MIYAZAWA en 1960 (2, 3), que les résultats empiriques ont été soumis à une analyse théorique et que les transitions qui correspondent aux diverses bandes sont connues. MIYAZAWA a analysé les bandes amide I et amide II en fonction d'un modèle d'un oscillateur faiblement couplé (2). Cette analyse a été précisée plus tard par KRIMM (4).

MIYAZAWA analysa le *trans*-N-méthyl-acétamide par un traitement en coordonnées normées, et il calcula les vibrations qui résultent dans les bandes amide I et amide II (5). Les résultats de ses calculs indiquent que la bande amide I est constituée pour 80 % par la vibration de déformation de la liaison C — O, pour 10 % par celle de C — N et pour 10 % par la vibration de la liaison dans le plan de N — H. Dans la bande amide II, 60 % de l'énergie potentielle sont liés à la vibration de NH et 40 % à la déformation de CN. Dans les amides simples, les positions de ces bandes se trouvent vers

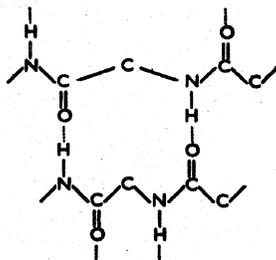
1 660 et 1 550 cm^{-1} . Dans le cas de structures complexes, telles que les polypeptides et protéines, la situation devient plus compliquée, car maintenant on ne trouve plus des groupements amides isolés, mais des groupements liés l'un à l'autre, donc non indépendants. Dans son analyse de l'effet de conformation sur les vibrations, MIYAZAWA a considéré deux couplages (2) : 1° le couplage à travers l'atome de carbone α , donné par la constante D_1 ; 2° le couplage à travers une liaison hydrogène, donné par la constante D'_1 . Le moment de transition dans un état excité est une fonction de la constante de couplage, multipliée par un facteur de phase. Dans le cas d'une conformation étendue, telle qu'une seule chaîne allongée, la chaîne polypeptidique a un double axe à vis, et la cellule unitaire contient deux groupements peptidiques en séquence :



Les vibrations permises correspondent aux moments de transition en phase (bande d'absorption parallèle), et hors de phase par 180° (π radians) (bande d'absorption perpendiculaire). Dans la structure β , dans laquelle un nombre de chaînes sont allongées parallèlement l'une à l'autre, la cellule unitaire doit contenir quatre groupements peptidiques, deux provenant de chaque chaîne. Deux genres de mailles sont possibles, une pour le cas de la structure β anti-parallèle :



l'autre pour la structure β parallèle :



Pour la structure β , quatre phases de transition sont possibles : deux pour chaque chaîne, avec le

dichroïsme correspondant :

$$\nu(0, 0) = \nu_0 + D_1 + D'_1 \parallel \quad (1)$$

$$\nu(\pi, 0) = \nu_0 - D_1 + D'_1 \perp \quad (2)$$

$$\nu(0, \pi) = \nu_0 + D_1 - D'_1 \parallel \quad (3)$$

$$\nu(\pi, \pi) = \nu_0 - D_1 - D'_1 \perp \quad (4)$$

ν_0 est la fréquence non perturbée d'un oscillateur isolé; les facteurs entre parenthèses sont les phases le long de la chaîne et ceux à travers une liaison hydrogène. Dans la structure antiparallèle, les moments s'annulent pour la transition, $\nu(0,0)$; dans la structure à chaînes parallèles, les transitions $\nu(0,\pi)$ et $\nu(\pi,\pi)$ sont inactives.

Pour l'hélice α droite, il y a deux modes de vibration dans la région amide I : un mode à angle de phase 0 (parallèle), l'autre à angle de phase $2\pi/3,6$ (perpendiculaire). KRIMM (4) fit l'analyse de cette structure en fonction de constantes de couplage, D_1 , D_2 , et D_3 , où D_2 est la constante pour l'interaction entre peptides 1 et 3, le long de la chaîne, et D_3 est la constante pour l'interaction entre peptides 1 et 4. Les fréquences et polarisations des bandes sont :

$$\nu(0) = \nu_0 + D_1 + D_2 + D_3 \parallel \quad (1)$$

$$\nu\left(\frac{2\pi}{3,6}\right) = \nu_0 + D_1 \cos\left(\frac{2\pi}{3,6}\right) + D_2 \cos 2\left(\frac{2\pi}{3,6}\right) + D_3 \cos 3\left(\frac{2\pi}{3,6}\right) \perp \quad (2)$$

Les positions et polarisations calculées, aussi bien que celles obtenues à l'état solide, des bandes amide I pour diverses conformations sont résumées dans le tableau I.

Dans le cas des solutions aqueuses, il n'est possible d'observer que les positions des bandes, car les macromolécules ne peuvent pas être orientées. Deux autres problèmes doivent être résolus : 1° l'effet des interactions entre solvant et macromolécule, dû à la dissolution; 2° l'effet de l'échange $\text{N-H} \rightarrow \text{N-D}$, quand on utilise l'eau deutérée, pour éviter l'absorption due à H_2O à $1\,650\text{ cm}^{-1}$.

Nous avons effectué une étude détaillée de ce genre sur l'acide polyglutamique et le poly-L-lysine (PLL) en films, aussi bien qu'en solution dans H_2O et D_2O ; les conditions sont telles que les polypeptides sont dans diverses conformations connues, telles que l'hélice α , la chaîne β antiparallèle et la structure désordonnée (6). Une étude similaire a été faite sur plusieurs protéines dissoutes dans H_2O et D_2O , aussi bien en films et qu'en cristaux (7, 8). Les résultats sont résumés dans le tableau I. Il est possible d'en tirer quelques conclusions : 1° les positions des bandes des protéines et polypeptides dans des conformations identiques ne sont pas nécessairement les mêmes; 2° la dissolution dans l'eau (ou D_2O) déplace les bandes dans le cas des structures dans lesquelles les groupements peptidiques peuvent interagir avec

TABLEAU I

Positions de la bande amide I pour polypeptides et protéines en conformations diverses.

Conformation	Mode	Frequence, cm^{-1} , calc. et films	Constantes de Couplage (4)	Observé en solution		
				PPL, dans D_2O	Protéines dans	
					D_2O	H_2O
Désordonnée	ν_0	1,658		1,643	1,643	1,656
Chaîne β antiparallèle	$\nu_{ } (0, \pi)$	1,685 (f)	$D_1 = 8$	1,680	1,675	1,690
	$\nu_{\perp} (\pi, 0)$	1,632 (F)	$D'_1 = -18$	1,611	1,632	1,632
	$\nu_{\perp} (\pi, \pi)$	1,668 (lf)				
Chaîne β parallèle	$\nu_{ } (0,0)$	1,648 (f)	$D_1 = 8$			
	$\nu_{\perp} (\pi, 0)$	1,632 (F)	$D'_1 = -18$			
	$\nu_{ } (0)$	1,650 (F)	$D_1 = 8$	1,635	1,650	1,652
Hélice α droite	$\nu_{ } (0)$	1,650 (F)	$D_2 = 2$			
	$\nu_{\perp} (2\pi/3, 6)$	1,646 (f)	$D_3 = D'_1 = -18$			

F: de forte intensité; f: de faible intensité; lf: de très faible intensité.

le solvant, par suite de porosité ou de fluctuations de la structure; 3° la dissolution dans l'eau des protéines globulaires dont les structures sont essentiellement immobilisées, telles que la myoglobine ou la β -lactoglobuline dans l'état natif, ne déplace pas la bande amide I; 4° l'échange $\text{N} - \text{H} \rightarrow \text{N} - \text{D}$ déplace les bandes dans le cas des structures du premier genre, mais non du second. Ces conclusions ont été vérifiées pour un nombre de protéines et polypeptides de structures connues et paraissent être générales (8). Il est donc possible d'effectuer à présent des études de conformation de protéines et, en particulier, de changements de leurs conformations, par l'absorption des rayons infrarouges dans la région de la bande amide I. D'autres structures hélicoïdales que nous avons examinées sont: l'hélice α gauche (poly-L-aspartate de benzyle), $1\,664\text{ cm}^{-1}$ (dans le chloroforme); polyproline I, $1\,649\text{ cm}^{-1}$ (dans le *n*-propanol); polyproline II, $1,625\text{ cm}^{-1}$ (dans D_2O). Les spectres des trois dernières structures n'ont pas été analysés par la théorie de MIYAZAWA. Donc, à présent, ces positions de bandes ne doivent servir que d'indices empiriques.

III. — Dichroïsme Circulaire.

La dispersion de la rotation optique a été utilisée depuis une dizaine d'années pour l'étude de la conformation des polypeptides et des protéines (9). Ce n'est que récemment, après le développement d'une instrumentation de sensibilité suffisante, que l'autre aspect du même phénomène, le dichroïsme circulaire,

a été utilisé dans des études similaires. Un certain nombre de polypeptides de conformations connues a été examiné par cette technique, et les positions des bandes ont été comparées avec la dispersion de la rotation optique par la transformation de KRONING-KRAMERS (10, 11). Comme dans la spectroscopie infrarouge, les transitions qui nous intéressent sont celles du groupement amide, et les positions des bandes dans diverses conformations sont une fonction des constantes de couplage entre les divers groupements dipolaires dans les mailles élémentaires. Dans la région de l'ultraviolet, ce sont les transitions électroniques et les interactions dipolaires, et non les vibrations atomiques, qui nous intéressent.

Les transitions qui prennent place dans les différentes conformations ont été le sujet de plusieurs études théoriques, aussi bien qu'expérimentales (12, 22). Les résultats sont résumés dans le tableau II, dans lequel nous avons indiqué les positions des bandes du dichroïsme circulaire et leurs amplitudes moyennes, données en unités d'ellipticité, $[\theta]$, en $10^{-3} \times \text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{décimole}$. Les positions des bandes et les signes de l'ellipticité sont suffisamment différents entre les diverses conformations pour permettre une distinction nette entre elles et une analyse, au moins qualitative, des conformations des protéines en solution. Des études sur la structure des protéines se développent actuellement (23-25), mais il est trop tôt pour dire si on peut espérer obtenir une information quantitative. Ce qui est bien apparent, c'est qu'une étude des mêmes échantillons par la spectroscopie infrarouge et le dichroïsme circulaire est capable de distinguer entre diverses conformations

de protéines et, en particulier, de permettre des études détaillées sur les transconformations des protéines.

TABLEAU II
Dichroïsme Circulaire ultraviolet des Polypeptides.

Conformation	Position de Bande $m\mu$	$[\theta']$	Transition
Hélice α	221-222	- 30	$n - \pi^*$
	207	- 29	$\pi - \pi^* \parallel$
	190-192	54	$\pi - \pi^* \perp$
Désordonnée	235-238	- 0,2	
	217	2,4	$n - \pi^*$
Chaîne β antiparallèle ..	196-202	30	$\pi - \pi^*$
	217	- 15	$n - \pi^*$
Chaîne β parallèle (théorie)	195	21,5	$\pi - \pi^*$
	216	- (f)	$n - \pi^*$; $\pi - \pi^* \parallel$
Poly-L-proline I (n-propanol)	181	+ (F)	$\pi - \pi^* \perp$
	236	- 4	
Poly-L-proline II (H ₂ O).	214	58	$\pi - \pi^* \parallel$
	200	- 30	$\pi - \pi^* \perp$
	221	15	$\pi - \pi^* \parallel$
Collagène en triple hélice	207	- 37	$\pi - \pi^* \perp$
	223	2	$n - \pi^*$
	198	- 22	$\pi - \pi^* \parallel$
	188	+	$\pi - \pi^* \perp$

F: bande d'intensité forte; f: bande d'intensité faible.
Les données de ce tableau sont tirées des travaux 12-22.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Voir, par exemple, S. N. TIMASHEFF et M. J. GORBUNOFF. — *Ann. Revs. Biochem.*, 1967, **36**, 13.
- (2) T. MIYAZAWA. — *J. Chem. Phys.*, 1960, **23**, 1647.
- (3) T. MIYAZAWA et E. R. BLOUT. — *J. amer. chem. Soc.*, 1961, **83**, 712.
- (4) S. KRIMM. — *J. Molec. Biol.*, 1962, **4**, 528.
- (5) T. MIYAZAWA, T. SHIMANOCHI et S. MIZUSHIMA. — *J. chem. Phys.*, 1958, **29**, 611.
- (6) H. SUSI, S. N. TIMASHEFF et L. STEVENS. — *J. biol. Chem.*, 1967, **242**, sous presse.
- (7) S. N. TIMASHEFF et H. SUSI. — *J. biol. Chem.*, 1966, **241**, 249.
- (8) S. N. TIMASHEFF, H. SUSI et L. STEVENS. — *J. biol. Chem.*, 1967, **242**, sous presse.
- (9) Voir, par exemple, P. URNES et P. DOTY. — *Advan. Protein Chem.*, 1961, **16**, 402.
- (10) W. MOFFITT et A. MOSCOWITZ. — *J. chem. Phys.*, 1959, **30**, 648.
- (11) A. MOSCOWITZ dans C. DJERASSI. — *Optical Rotatory Dispersion*, McGraw-Hill, New York, 1960, p. 150.
- (12) R. W. WOODY. — *Dissertation*, Univ. California Berkeley, 1962.
- (13) E. S. PYSH. — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, U.S., 1966, **56**, 825.
- (14) E. S. PYSH. — *J. Molec. Biol.*, 1967, **23**, 587.

- (15) G. HOLZWARH et P. DOTY. — *J. amer. chem. Soc.*, 1965, **87**, 218.
- (16) J. BRAHMS et G. SPACH. — *Nature*, 1963, **200**, 72.
- (17) M. GROSJEAN et M. TARI. — *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 1964, **258**, 2034.
- (18) L. VELLUZ et M. LEGRAND. — *Angew. Chem. int. Ed.*, 1965, **4**, 838.
- (19) R. TOWNEND, T. F. KUMOSINSKI, S. N. TIMASHEFF, G. D. FASMAN et B. DAVIDSON. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1966, **23**, 163.
- (20) P. K. SARKAR et P. DOTY. — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, U.S., 1966, **55**, 981.
- (21) J. P. CARVER, E. SHECHTER et E. R. BLOUT. — *J. amer. chem. Soc.*, 1966, **88**, 2550.
- (22) S. N. TIMASHEFF, H. SUSI, R. TOWNEND, L. STEVENS, M. J. GORBUNOFF et T. F. KUMOSINSKI dans G. N. RAMACHANDRAN. — *Conformation of Biopolymers*, Academic Press, London, 1967, p. 173.
- (23) S. N. TIMASHEFF, R. TOWNEND et G. PERLMANN. — *J. biol. Chem.*, 1967, **242**, 2290.
- (24) R. TOWNEND, T. F. KUMOSINSKI et S. N. TIMASHEFF. — *J. biol. Chem.*, 1967, **242**, 4538.
- (25) S. N. TIMASHEFF et L. STEVENS. — Manuscrit en préparation.

DISCUSSION

E. Shechter. — Les bandes amide I de la poly-L-lysine dans différentes conformations en solution dans le D₂O sont déplacées par rapport aux positions calculées par la théorie et par rapport aux positions observées pour les protéines. Pensez-vous que ce déplacement est spécifique à la poly-L-lysine ou l'avez-vous observé pour d'autres polypeptides de synthèse?

S. N. Timasheff. — Ce déplacement n'est pas spécifique à la poly-L-lysine. Il a été observé également sur d'autres polypeptides de synthèse telles que l'acide polyglutamique. C'est pourquoi il n'est pas possible d'utiliser directement les positions des bandes trouvées avec des polypeptides pour établir la structure des protéines, mais il est nécessaire de commencer avec des protéines de structure connue.

A. Hue. — Dans le cas où une protéine comporte deux structures différentes dans un même échantillon, avez-vous toujours observé un dédoublement de la bande amide I?

S. N. Timasheff. — Non. Cela dépend du contenu des structures. Normalement, dans un cas pareil, nous n'observons que des épaulements.

J. Lascombe. — Dans un certain nombre de cas, ne faut-il pas tenir compte plus explicitement des liaisons intermoléculaires entre le solvant et les molécules de protéine ou de polypeptides. N'y a-t-il pas certaines bandes correspondant à des formes plus ou moins désordonnées associées au solvant et dont la fréquence varierait selon la nature de ce dernier?

D. Pantaloni. — Le fait de substituer le deutérium à l'hydrogène dans les protéines ne risque-t-il pas de modifier la structure de ces protéines?

S. N. Timasheff. — Oui, une telle substitution pourrait modifier la structure. Il est bien connu que les protéines deutérées se dénaturent à des températures et pH différents de ceux que l'on observe pour les protéines à l'état natif, c'est-à-dire non deutéré. C'est pourquoi il faut toujours comparer les spectres infrarouges des protéines dissoutes dans le D₂O avec les spectres obtenus sur des films ou des cristaux suspendus dans le nujol. Ayant examiné une douzaine de protéines globulaires, nous n'avons jamais trouvé de changements dans les bandes principales, ce qui nous indique qu'il n'y avait pas de modification de structure importante.